

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-58936

(43)公開日 平成6年(1994)3月4日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/535		8310-2 J		
33/53	V	8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-214070	(71)出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22)出願日	平成4年(1992)8月11日	(72)発明者	川辺 俊樹 滋賀県大津市真野2-28-1-701
		(72)発明者	篠田 潤一郎 京都府京都市西京区大原野西境谷町2-9-26-403
		(72)発明者	吉川 勝己 大阪府門真市南野口町10-16
		(72)発明者	高原 誠 大阪府三島郡島本町百山2-2

(54)【発明の名称】 糖化蛋白の測定方法

(57)【要約】

【構成】測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体および標識化合物を用いたサンドイッチ法により特定の糖化蛋白を測定する方法であって、前記標識化合物が酵素標識ジヒドロキシボリル化合物であることを特徴とする糖化蛋白の測定方法。

【効果】本発明の測定方法により、糖化蛋白の測定において、例えば、糖化アルブミン量と総アルブミン量を別々に測定することなく、簡便に総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の相対比を求めることができるので、糖化蛋白を容易に測定することが可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体および標識化合物を用いたサンドイッチ法により特定の糖化蛋白を測定する方法であって、前記標識化合物が酵素標識ジヒドロキシボリル化合物であることを特徴とする糖化蛋白の測定方法。

【請求項2】 以下の工程を有する糖化蛋白の測定方法。

- ① 測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体と試料中の糖化蛋白を反応させて、固相化抗体-糖化蛋白複合物を形成させる工程、
- ② 酵素標識ジヒドロキシボリル化合物と前記固相化抗体-糖化蛋白複合物を反応させて、固相上に前記固相化抗体-糖化蛋白を介して前記酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を結合させる工程、および
- ③ 洗浄後、固相上の酵素活性を測定する工程。

【請求項3】 請求項2記載の工程①と工程②の間に洗浄工程をさらに有することを特徴とする請求項2記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は糖化蛋白の測定方法に関する。更に詳しくは、例えば糖尿病の診断マーカーとして有用な糖化蛋白を測定する方法に関するものであり、臨床検査分野等で利用される測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】 血液中の蛋白成分であるアルブミンや赤血球中のヘモグロビンはグルコースと非酵素的に反応して糖化され、糖化蛋白となることが知られている。この糖化を受ける蛋白の量は、その蛋白が生体中に存在していた期間の体内のグルコース量に比例しているため、体内の蛋白中の糖化蛋白量を測定することは、糖尿病の診断等の臨床検査分野において有用である。

【0003】 このような糖化蛋白量を測定するマーカーとしては、例えば、ヘモグロビンA1c (HbA1c) あるいはフルクトサミン等が挙げられる。HbA1cは、ヘモグロビンのβサブユニットのN末端アミノ酸にグルコースが結合したもので、臨床検査において用いられるマーカーの一つである。HbA1cを用いる糖化蛋白量の測定は、充填剤としてイオン交換樹脂を使用した専用の高速液体クロマトグラフ (HPLC) によりおこなわれる (例えば、特開昭63-298063号公報)。この測定法によるHbA1c値は総ヘモグロビン量に対するHbA1c量の相対パーセントで示されるため、測定値が被検試料中に含まれるヘモグロビン量の影響を受けないという特徴があるものの、異常ヘモグロビン (例えばHbS) の影響を受けることがあるという問題がある。

【0004】 また、フルクトサミンをマーカーとして用いる測定法は、糖化蛋白の還元性を利用した比色法であり、生化学検査用の自動測定機を用いて血漿あるいは血清中に含まれている糖化蛋白量を測定する方法である。この測定法によると、糖化蛋白量の絶対量としてフルクトサミンの測定値が示されるので、測定値が試料中に含まれている蛋白量の影響を受けるという問題がある。

【0005】 また、他の測定法として、ボロン酸アフィニティー法を利用した、HPLCを用いた糖化蛋白質の測定法が知られている。ボロン酸アフィニティー法は、ボロン酸が弱アルカリ条件下でシス・ジオール基を持つ物質と可逆的な結合体を作ることを利用した方法であり、例えば、クロマトグラフィー用の充填剤としてアミノフェニルボロン酸をセルロースやポリアクリルアミド樹脂に結合させた例が報告されている。ボロン酸は弱アルカリの条件下でボロン酸陰イオンとなり、シス・ジオール基を持つ物質と安定な結合体を形成する。この結合体は可逆的でpHを酸性側にするにより分離する。この性質を利用して充填剤としてボロン酸を使用することによって、シス・ジオール基を持つ物質の充填剤への吸着・脱着をpHの変化だけでコントロールすることができる。

【0006】 ボロン酸アフィニティー法を利用した、HPLCを用いる糖化アルブミンの測定について、その専用測定機は未だ当業界に普及していないものの、特開平2-96657号公報によると、この測定法による糖化アルブミン値は、血漿あるいは血清試料中に含まれているアルブミンのうち、糖化されたアルブミン量の総アルブミン量に対する相対パーセントで示される旨が記載されている。従って、フルクトサミンをマーカーとする測定法等で問題になっている試料中の蛋白量変動による測定値への影響がないことから、糖尿病の診断等の臨床検査分野において非常に有用であると考えられる。

【0007】 即ち、ボロン酸アフィニティー法を利用した、上記のHPLCによる糖化アルブミンの測定法として同公報には、第1カラムで試料中のアルブミンと他の蛋白を分離した後、アルブミンのみを第2カラム (ボロン酸アフィニティーカラム) に導き糖化アルブミンと非糖化アルブミンに分離する方法が記載されている。また、その他のHPLCによる糖化アルブミンの測定法として、臨床化学、第20巻補冊2号 (1991年) 中の34b頁及び35b頁では試料をボロン酸アフィニティーカラムにより糖化成分と非糖化成分に分離した後、アルブミンのみと特異的に結合する色素 (ブロムクレゾールパープル) を用いて、ポストカラム法によりアルブミンを検出する方法が記載されている。

【0008】 また、他の測定法として、糖化蛋白に対する特異的抗体を用いて糖化蛋白を検出して測定に用いる方法が開発されており、ELISA法による糖化アルブミンの測定キットがアメリカのEXOCCELL, IN

C. 社からGLYCABENの商品名で販売されている。ここでいうELISA法とは、固相化抗ヒト糖化アルブミンモノクローナル抗体と酵素標識抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体とのサンドイッチ法である。このキットでは、試料中の糖化アルブミン量をELISA法で、総アルブミン量をBCG（ブロムクレゾールグリーン）法で別々に測定し、測定値を総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の比（パーセント）で表すようになっている。

【0009】しかしながら、前記HPLC法による測定は1検体当たりの測定時間が長いため、同時に多数検体の測定ができないという問題がある。また、前記ELISA法による測定キットを用いた測定では、総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の存在比を測定するためには、糖化アルブミン量と総アルブミン量を別々に測定する必要があるため、非常に手間のかかるものである。また、前記ELISA法による測定キットを用いた測定では、固相化抗ヒト糖化アルブミン抗体としてアルブミンの糖化部位を認識するモノクローナル抗体を使用しているが、ヒトアルブミンは4カ所の糖化を受ける部位があるため、1種のモノクローナル抗体だけでは糖化アルブミン量を正確に測定することはできないという欠点を有している。このように糖化アルブミンに対するモノクローナル抗体を利用した糖化アルブミンの測定は、抗原-抗体反応を利用するので特異性に優れているものの、全ての糖化アルブミンを認識できる抗体を作製することは困難であるという問題がある。

【0010】また、他の免疫学的な測定法として、特開昭62-100660号公報には、糖化蛋白質を特異的に吸着するフェニルボロン酸などの基質特異性/親和性の吸着体を結合させた固相とある特定の蛋白質にのみ特異的親和性を有する標識化抗体を用いる方法により、ある特定糖化蛋白質のみを特異的に測定する方法が記載されている。この方法は、ある特定糖化蛋白質の存在量を特異的に測定できる点で優れた方法であるが、フェニルボロン酸に結合するのは種々の糖化蛋白質であるため、臨床的に意義のある特定蛋白質の糖化割合を測定するためには特定蛋白質の総量を別に測定することが必須であるという問題がある。

【0011】また、他の免疫学的な測定法として、特開昭64-16964号公報には、特定蛋白質に対する抗体を担体上に固定化した固相化抗体と被検液とを反応させた後、固相上の遊離の糖を除去し、還元剤を用いて糖化蛋白質の糖化部分を還元型に還元し、該還元反応時または還元反応後標識化抗還元型糖化蛋白質抗体を反応させ、固相と液相を分離し、いずれかの相の標識量を測定し、その測定値から特定糖化蛋白質含量を測定する方法が記載されている。この方法は、被検液として固相上に固定化した既定量の抗体のすべてに特定蛋白質が結合しうる濃度以上で特定蛋白質を含有しうるものを用いるこ

とにより、同一の固相化抗体に結合する特定蛋白質量は常に一定となるため、特定蛋白質の総量を測定する手間を省くことができるという点で優れた方法であるが、還元工程が必要であるので操作が複雑化すること、抗還元型糖化蛋白質抗体が必要であるがロット間差のない抗体の作製が容易でないことなどの問題がある。

【0012】従って、本発明の目的は糖化蛋白の測定方法であって、糖化蛋白の存在比を簡易に測定することのできる方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明に到達した。すなわち、本発明の要旨は、測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体および標識化合物を用いたサンドイッチ法により特定の糖化蛋白を測定する方法であって、前記標識化合物が酵素標識ジヒドロキシポリル化合物であることを特徴とする糖化蛋白の測定方法に関する。その具体的な態様としては、次のような態様がある。

【0014】（1）以下の工程を有する糖化蛋白の測定方法、

- ① 測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体と試料中の糖化蛋白を反応させて、固相化抗体-糖化蛋白複合物を形成させる工程、
- ② 酵素標識ジヒドロキシポリル化合物と前記固相化抗体-糖化蛋白複合物を反応させて、固相上に前記固相化抗体-糖化蛋白を介して前記酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させる工程、および
- ③ 洗浄後、固相上の酵素活性を測定する工程、

（2）前記（1）記載の工程①と工程②の間に洗浄工程をさらに有する糖化蛋白の測定方法、

（3）以下の工程を有する糖化蛋白の測定方法、

- ① 酵素標識ジヒドロキシポリル化合物と試料中の糖化蛋白を反応させて、酵素標識ジヒドロキシポリル化合物-糖化蛋白複合物を形成させる工程、
- ② 測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体と前記酵素標識ジヒドロキシポリル化合物-糖化蛋白複合物を反応させて、固相上に前記固相化抗体-糖化蛋白を介して前記酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させる工程、および
- ③ 洗浄後、固相上の酵素活性を測定する工程、

（4）測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体、試料中の糖化蛋白および酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を実質的に同時に反応させて、固相化抗体-糖化蛋白-酵素標識ジヒドロキシポリル化合物の複合物を形成させ、次いで洗浄後、固相上の酵素活性を測定することを特徴とする糖化蛋白の測定方法。

【0015】本発明の測定方法は、前記のように測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有

する固相化抗体および標識化合物を用いたサンドイッチ法により特定の糖化蛋白を測定する方法に関するものであるが、本発明というサンドイッチ法とは、測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する蛋白を固相化抗体と標識化合物の間にサンドイッチ状に挟んで結合させ、固相化抗体—測定対象となる蛋白—標識化合物の複合体を形成せしめ、該標識化合物の標識を利用して測定対象となる蛋白の存在量を測定する方法をいう。

【0016】以下に本発明の糖化蛋白の測定方法について、測定対象となる蛋白が糖化アルブミンである場合について例示し、更に詳しく説明するが、本発明の測定方法の対象となる糖化蛋白は特にこれに限定されるものではなく、例えば糖化ヘモグロビン等も同様に本発明の測定方法の対象となる。また測定対象となる糖化蛋白を有する試料は、前記のような糖化タンパクを含有する生体由来のものであればよく、たとえば尿、血液、各種臓器抽出物等があげられる。

【0017】本発明による測定の原理を以下に述べる。

(1) 糖化アルブミンの蛋白部分に対して特異的結合能を有する抗体をプレート等に固相化させた固相化抗体と試料を反応させることにより、試料中のアルブミンおよび糖化アルブミンの蛋白部分が該固相化抗体と結合した固相化抗体—アルブミン複合物および固相化抗体—糖化アルブミン複合物が形成される。

(2) 固相化抗体に結合しなかった試料中の成分を吸引除去し、固相を洗浄する。

(3) 結合した糖化アルブミンに対して過剰量の酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を、(2)の洗浄工程により得られた固相に添加して、固相化抗体—糖化アルブミン複合物を、弱アルカリ条件下で反応させる。この反応で固相に結合している糖化アルブミン中のシス・ジオール基と酵素標識ジヒドロキシボリル化合物のボロン酸陰イオンが結合する。一方、固相化抗体—アルブミン複合物はシス・ジオール基を持たないため酵素標識ジヒドロキシボリル化合物と何ら反応することなく存在している。

(4) 反応に関与しなかった遊離の酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を吸引除去し、固相を洗浄した後、基質液を添加して発色させて酵素活性を測定する。

(5) 標準試料の測定により得られる糖化アルブミン量と発色量の関係から検量線を作成し、これを用いて測定試料中の糖化アルブミン量を計算する。

【0018】上記の本発明の測定方法の各工程について以下に更に詳しく述べる。

(1)の工程における固相化抗体に用いる抗体としては、糖化アルブミンの蛋白部分に特異的結合能を有するものである。従って、糖化されていないアルブミン自体に対しても特異的結合能を有するが、その結合能が糖化アルブミンと非糖化アルブミンで差がなければ、モノク

ローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。中でも測定結果のより高い再現性を確保する点からモノクローナル抗体が好ましく、またその場合アルブミンに対してグルコースが結合するリジン残基から立体的に離れた位置に抗原決定基を持つモノクローナル抗体であることが、糖化アルブミンと非糖化アルブミンで特異的結合能に差のない抗体を得る上でより好ましい。

【0019】このような抗体を固定化する固相としては、シス・ジオール基を含有せず本測定法における各工程が行なえればよく、その材質としては主に無機物質粉末、合成高分子を含む有機物質が挙げられる。無機物質粉末としては、ガラス、シリカもしくはアルミナまたは金、チタン、鉄もしくはニッケル等の金属片が挙げられる。また、その形状としては、フレーク状、ビーズ状、管状、また樹脂を成形して得たプレート状のものいずれもが使用できる。測定における各工程を自動化する観点からはマイクロプレートが特に好ましい。固相に抗体を結合させるには、蛋白を固相に結合させる公知の方法を適宜使用することができ、物理的吸着、化学的結合のいずれも使用することができる。なお、用いる抗体は糖鎖を有するため、あらかじめグリコペプチダーゼ（アーモンド由来）またはN-グリカナーゼなどによる酵素処理により糖鎖をFcフラグメントから除去するか、またはペプシン処理によりF(ab')₂の形にし、糖鎖部分を有するFcフラグメントを除くなどの公知の方法により、抗体に由来する糖鎖の影響を除去してから固相に抗体を結合させてもよい。

【0020】本発明の方法において、糖化アルブミンと非糖化アルブミンの存在比を算出する場合には、固相に固定化する抗体量を一定にしておくことが必要となる。即ち、固相化抗体に結合するアルブミンおよび糖化アルブミンの総和を一定にしておくことにより、後述の

(5)の工程における検量線による糖化アルブミンの計算値を、総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の相対比とすることができる。このような点から固相に所定量の抗体を固定化した後に、過剰の抗体が固相化されないためにブロッキング剤を使用するのが好ましい。このようなブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼインおよび界面活性剤等が挙げられる。該ブロッキング剤がシス・ジオール基を有している場合、バックグラウンドが大きくなるため、あらかじめ、ボロン酸アフィニティーカラムクロマトグラフィー法、酵素による糖鎖除去法等の公知の手法により、これらのブロッキング剤の成分から糖化成分を除去しておくことが測定感度を向上させる上で望ましい。しかしながら、該ブロッキング剤が仮にシス・ジオール基を有していたとしても、各ロット（測定バッチ）内においてブロッキング剤の成分中のシス・ジオール基量さえ一定であれば、糖化アルブミン量の測定は可能である。

【0021】前記(1)の工程では、固定化された抗体

量を一定にしておき、かつ固相化抗体の全抗体と反応するのに十分な量のアルブミン及び糖化アルブミンを含む試料を固相化抗体と反応させることにより、結合するアルブミン及び糖化アルブミンの総量を各測定バッチ内で同量とすることができる。さらに固相化抗体として、前記のように糖化アルブミンに対しての特異性と非糖化アルブミンに対しての特異性において差のないものを用いることにより、試料との反応後の固相化抗体-アルブミン複合物と固相化抗体-糖化アルブミン複合物の存在比をもって試料中の糖化アルブミンと非糖化アルブミンの存在比とみることが出来る。

【0022】(2)の洗浄工程に用いる洗浄液としては、生理食塩水、リン酸またはトリス-塩酸等の緩衝液が好ましい。また、これらの緩衝液等に界面活性剤等を含有させてもよい。なお、この工程は(4)の洗浄工程で代用することができるので、省略することが可能である。

【0023】(3)の工程で用いる酵素標識ジヒドロキシポリル化合物としては、アミノフェニルボロン酸等の酵素標識物が挙げられ、特にアミノフェニルボロン酸の酵素標識物が好ましい。ジヒドロキシポリル化合物を酵素標識するには、2段階グルタルアルデヒド法、マレイミド法およびピリジル・ジスルフィド法等の公知の標識法(石川 榮治ら、酵素免疫測定法 第3版、医学書院(1987年)等に記載されている)を用いて、ジヒドロキシポリル化合物中のアミノ基と酵素中の官能基(例えばアミノ基やチオール基など)の架橋反応により容易に酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を得ることができるが、高収率および高再現性を得るためにはマレイミド法を選択することが好ましい。

【0024】なお、ジヒドロキシポリル化合物に対する標識酵素としては、シス・ジオール基を含有せず、前記ジヒドロキシポリル化合物との結合反応に用いるアミノ基またはチオール基等の官能基をもち、酵素-基質反応により発色性を示すものであれば、特に限定されるものではない。糖化アルブミン中のシス・ジオール基と酵素標識ジヒドロキシポリル化合物のボロン酸陰イオンは、 $\text{pH} 7.5 \sim 9.5$ 程度の弱アルカリ下で結合するので、反応試薬の種類を減らして工程を簡略化する目的から、シス・ジオール基を含有せず、かつ $\text{pH} 7.5 \sim 9.5$ 程度の弱アルカリ下で酵素反応が進む酵素を選択することが望ましい。例えば、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが挙げられ、特に酵素の至適 pH の点から β -D-ガラクトシダーゼが好ましい。また、弱アルカリ下以外の pH 条件で酵素反応が進む酵素を用いるときは、糖化アルブミンと酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を弱アルカリ下で結合させ、

(4)の工程で過剰の遊離の酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を吸引除去し、固相を洗浄した後、使用する酵素の酵素-基質反応に好適な pH 条件となるように調節

すればよい。酵素標識ジヒドロキシポリル化合物と固相化抗体-糖化アルブミン複合物の反応は、 $\text{pH} 7.5 \sim 9.5$ 下にて反応温度 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、反応時間は30分から2時間で行われる。これにより固相上に前記固相化抗体-糖化蛋白を介して酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させることができる。

【0025】(4)の工程で用いる基質液とは、(3)の工程で用いた酵素標識ジヒドロキシポリル化合物の標識酵素に対する基質を含有する溶液である。この洗浄工程に用いる洗浄液としては、前記(2)の工程と同様にトリス-塩酸緩衝液等が好ましい。

【0026】(5)の工程において、標準試料の測定により得られる糖化アルブミン量と発色量(吸光度)の関係から得られる検量線を基礎にした計算により得られる糖化アルブミン量は絶対量であるが、固相化抗体の量をあらかじめ一定にしておいて過剰の試料と接触させれば、抗体に反応する試料(標準試料あるいは測定試料)中のアルブミン量も一定となるので、検量線から計算する過程で絶対量である糖化アルブミン量(横軸)を総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の相対比(パーセント、横軸)で置き換えて糖化アルブミン値(パーセント)とすることができる。すなわち、総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の比を一度に測定することが可能になる。

【0027】なお、本発明の測定方法において、前記

(1)の工程(固相化抗体-アルブミン複合物、固相化抗体-糖化アルブミン複合物を形成する工程)と、前記

(3)の工程(糖化アルブミンと酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させる工程)の工程の順序を逆にしてもよい。即ち、まず先に(a)試料中の糖化アルブミンと酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を反応させて結合させ、酵素標識ジヒドロキシポリル化合物-糖化蛋白複合物を形成させる。この場合、糖化されていない非糖化アルブミンは、酵素標識ジヒドロキシポリル化合物とは反応することなくそのままの状態で混在する。なお、この(a)工程において、糖化アルブミンと酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させる反応は、前記

(3)の工程の場合と同一の反応条件で行うことができる。次に、(b)測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体と前記酵素標識ジヒドロキシポリル化合物-糖化蛋白複合物を反応させて、固相上に前記固相化抗体-糖化蛋白を介して前記酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させる。ここで用いる固相化抗体は、前記のように糖化アルブミンに対しての特異性と非糖化アルブミンに対しての特異性において差のないものを使用するので、糖化アルブミンの存在比に応じた量が固相化抗体と結合する。これにより固相上に固相化抗体-糖化蛋白を介して酵素標識ジヒドロキシポリル化合物を結合させることができる。次に

(c)固相に結合していない遊離の酵素標識ジヒドロキ

シボリル化合物や酵素標識ジヒドロキシボリル化合物-糖化蛋白複合物等を除去して固相を洗浄し、(d)前記の方法と同様にして固相上の酵素活性を測定する。この方法によれば、糖化アルブミンと酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を結合させる(a)工程と固相化抗体-アルブミン複合物、固相化抗体-糖化アルブミン複合物を形成する(b)工程の間には洗浄工程は不要である点で簡易な方法といえる。

【0028】また、本発明においては、前記(1)の工程及び(3)の工程を実質的に同時に行い、工程

(4)、工程(5)に入ることも可能である。即ち、測定対象となる糖化蛋白の蛋白部分に対して特異的結合能を有する固相化抗体、試料中の糖化蛋白および酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を実質的に同時に反応させて、固相化抗体-糖化蛋白-酵素標識ジヒドロキシボリル化合物の複合物を形成させ、次いで洗浄後、固相上の酵素活性を測定する。この場合、固相化抗体、糖化アルブミン及び酵素標識ジヒドロキシボリル化合物を結合させる反応は、pH7.5~9.5下にて反応温度20~40℃、反応時間は30分~2時間で行われる。

【0029】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなら限定されるものではない。なお、本実施例においては、以下の試薬および試料を用いた。

(1) PBS (リン酸緩衝液)の調製:リン酸一ナトリウム(2水和物)、リン酸二ナトリウム(2水和物)および塩化ナトリウムをリン酸及び塩化ナトリウムの終濃度がそれぞれ0.02M、0.15Mとなるように、また、pHが7.2となるように精製水を加えて調製した。

(2) 1%カゼインナトリウム-PBSの調製:前記PBSにカゼインナトリウム(和光純薬製 化学用)を1%(W/V)となるように溶解した。

(3) 測定試料の調製:5名の健常者および5名の糖尿病患者より採取した血液を室温で60分放置した後、3000rpmで10分間遠心し、上清(血清)を測定試料とした。表1~表4中の1~5は健常者、6~10は糖尿病患者より得られた試料を示す。

(4) 標準試料の調製:イン・ビトロでヒト血清アルブミン(HSA、シグマ社製)とグルコースを、蒸留水1L中にHSAが40g、グルコースが18g含まれるように加え、インキュベート(37℃、7日間)した。そして、これをボロン酸アフィニティーカラムクロマトグラフィー(アイソラブ社製)を用いて、糖化アルブミンと非糖化アルブミンを分離・分取し、糖化割合が0.0、10.0、20.0、40.0%となるようにそれぞれを混合後、生理食塩水を用いて総アルブミン濃度が4g/dlになるように調製し、標準試料とした。

【0030】実験例1

抗ヒトアルブミン抗体(ポリクローナル抗体)のマイクロタイタープレートへの固定化

糖化アルブミンの蛋白部分に対して特異的結合能を有する抗体として、抗ヒトアルブミン抗体IgG分画を使用した。この抗体のマイクロタイタープレートへの固定化は、物理的吸着により行った。即ち、抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体IgG分画(ヤギ由来、コスモバイオ社製)を30μg/mlとなるようにPBSに分散させ、この溶液100μlを96穴マイクロタイタープレート(ファルコン社製)2枚の各ウェルに加え4℃で一晩放置した。各ウェルの吸着量を調べるため、一晩放置後1枚のプレートの上清50μlを取り、ピアス社蛋白定量キットにて上清中の蛋白(IgG)量を測定した。吸着IgG量(添加IgG量-上清IgG量)は平均82ng(96ウェルについての平均値。変動係数は4.1%)であり、各ウェルにほぼ均一に吸着しているものと考えられた。もう一枚のプレートは、IgG溶液をアスピレーターで除去後生理食塩水で3回洗浄した。その後1%カゼインナトリウム-PBSを各ウェルに200μl加え37℃で2時間ブロッキングした。その後、生理食塩水で3回洗浄し、抗ヒトアルブミン抗体固定化マイクロタイタープレートを作製した。

【0031】実験例2

抗ヒトアルブミン抗体(モノクローナル抗体)のマイクロタイタープレートへの固定化

糖化アルブミンの蛋白部分に対して特異的結合能を有する抗体として、抗ヒトアルブミン抗体IgG分画を使用した。この抗体のマイクロタイタープレートへの固定化は、物理的吸着により行った。即ち、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体IgG分画(マウス由来、サブクラスIgG1、コスモバイオ社製)を30μg/mlとなるようにPBSに分散させ、この溶液100μlを96穴マイクロタイタープレート(ファルコン社製)2枚の各ウェルに加え4℃で一晩放置した。各ウェルの吸着量を調べるため、一晩放置後1枚のプレートの上清50μlを取り、ピアス社蛋白定量キットにて上清中の蛋白(IgG)量を測定した。吸着IgG量(添加IgG量-上清IgG量)は平均68ng(96ウェルについての平均値。変動係数は3.6%)であり、各ウェルにほぼ均一に吸着しているものと考えられた。もう一枚のプレートは、IgG溶液をアスピレーターで除去後生理食塩水で3回洗浄した。その後1%カゼインナトリウム-PBSを各ウェルに200μl加え37℃で2時間ブロッキングした。その後、生理食塩水で3回洗浄し、抗ヒトアルブミン抗体固定化マイクロタイタープレートを作成した。

【0032】実験例3

酵素標識ジヒドロキシボリル化合物の調製

アミノフェニルボロン酸9.5mg(70μmol)およびマレイミド基導入試薬としてN-スクシンイミジル

6-マレイミドヘキサノエート21mg (70 μ mol)を、pH7.0に調整したリン酸緩衝液0.1mol/l, 100ml中で、30℃にて1時間インキュベートを行った。その後、沈殿物を遠心除去し、ゲル濾過クロマトグラフィーによりマレイミド基が導入された生成物を精製した。次に、該精製物0.5mg (1.5 μ mol)に β -ガラクトシダーゼ300mg (550nmol)あるいはアルカリホスファターゼ60mg (550nmol)を添加し、pH6.0に調整したリン酸緩衝液0.1mol/l, 10ml中で、30℃にて1時間インキュベートを行った。得られた反応生成物をゲル濾過クロマトグラフィーで処理することにより、未反応のマレイミド基が導入されたアミノフェニルボロン酸および β -ガラクトシダーゼあるいはアルカリホスファターゼの重合体等の副反応生成物を除去した。さらに、充填剤としてデキストランゲルを用いたボロン酸アフィニティークロマトグラフィーにより未反応の β -ガラクトシダーゼあるいはアルカリホスファターゼを除去することにより、 β -ガラクトシダーゼ結合ジヒドロキシボリル化合物が11mg/ml (約20nmol/ml)あるいはアルカリホスファターゼ結合ジヒドロキシボリル化合物が2mg/ml (約20nmol/ml)含まれる、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 20mlを調製した。

【0033】実施例1

抗ヒトアルブミン抗体 (ポリクローナル抗体) と β -ガ

ラクトシダーゼ結合ジヒドロキシボリル化合物を用いるヒト血清中の糖化アルブミン値の測定

実験例1により得られた抗ヒトアルブミン抗体結合マイクロプレートの各ウェルに標準試料又は測定試料各々50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応液を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、試料中の未反応のアルブミンおよび糖化アルブミンを除去した。その後、実験例3により得られた β -ガラクトシダーゼ結合ジヒドロキシボリル化合物溶液200 μ lを計り入れ、更に室温で120分インキュベートした。反応液を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、洗浄液を各ウェルから除去した後、 β -ガラクトシダーゼ活性測定のため100mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、2mM α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシドを含有する100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応を停止するために1N水酸化ナトリウム溶液200 μ lを混合し、波長420nmで吸光度を測定した。標準試料と測定試料の吸光度から試料中の糖化アルブミン値を求めた。その結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

		糖化アルブミン値 (%)	吸光度
標準試料		0.0	0.088
		10.0	0.182
		20.0	0.290
		40.0	0.401
測定試料	1	12.5	0.207
	2	15.5	0.238
	3	17.1	0.254
	4	17.5	0.259
	5	19.2	0.276
	6	32.4	0.359
	7	35.5	0.376
	8	38.4	0.392
	9	39.8	0.400
	10	43.8	0.422

【0035】実施例2

抗ヒトアルブミン抗体 (モノクローナル抗体) と β -ガラクトシダーゼ結合ジヒドロキシボリル化合物を用いるヒト血清中の糖化アルブミン値の測定

実験例2により得られた抗ヒトアルブミン抗体結合マイクロプレートの各ウェルに標準試料及び測定試料各々50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。

反応液を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、試料中の未反応のアルブミンおよび糖化アルブミンを除去した。その後、実験例3により得られた β -ガラクトシダーゼ結合ジヒドロキシボリル化合物溶液200 μ lを計り入れ、更に室温で120分インキュベートした。反応液を

各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、洗浄液を各ウェルから除去した後、 β -ガラクトシダーゼ活性測定のため100mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、2mM *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシドを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）

50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応を停止するために1N水酸化ナトリウム溶液200 μ lを混合し、波長420nmで吸光度を測定した。標準試料と測定試料の吸光度から試料中の糖化アルブミン値を求めた。その結果を表2に示す。

【0036】

【表2】

		糖化アルブミン値 (%)	吸光度
標準試料		0.0	0.102
		10.0	0.204
		20.0	0.310
		40.0	0.519
測定試料	1	11.6	0.221
	2	14.5	0.252
	3	17.5	0.283
	4	18.1	0.290
	5	19.8	0.308
	6	33.8	0.454
	7	36.6	0.483
	8	37.3	0.491
	9	38.5	0.503
	10	40.2	0.521

【0037】実施例3

抗ヒトアルブミン抗体（ポリクローナル抗体）とアルカリホスファターゼ結合ジヒドロキシポリル化合物を用いるヒト血清中の糖化アルブミン値の測定

実験例1により得られた抗ヒトアルブミン抗体結合マイクロプレート各ウェルに標準試料及び測定試料各々50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応液を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、試料中の未反応のアルブミンおよび糖化アルブミンを除去した。その後、実験例3により得られたアルカリホスファターゼ結合ジヒドロキシポリル化合物溶液200 μ lを計り入れ、更に室温で120分インキュベートした。反応液

を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、洗浄液を各ウェルから除去した後、アルカリホスファターゼ活性測定のため100mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、2mM *p*-ニトロフェニルリン酸を含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応を停止するために1N水酸化ナトリウム溶液200 μ lを混合し、波長410nmで吸光度を測定する。標準試料と測定試料の吸光度から試料中の糖化アルブミン値を求めた。その結果を表3に示す。

【0038】

【表3】

		糖化アルブミン値 (%)	吸光度
標準試料		0. 0	0. 034
		10. 0	0. 108
		20. 0	0. 170
		40. 0	0. 320
測定試料	1	13. 1	0. 127
	2	13. 4	0. 129
	3	13. 5	0. 130
	4	17. 1	0. 152
	5	19. 4	0. 166
	6	36. 1	0. 291
	7	37. 6	0. 302
	8	38. 7	0. 310
	9	39. 7	0. 318
	10	42. 9	0. 342

【0039】実施例4

抗ヒトアルブミン抗体（モノクローナル抗体）とアルカリホスファターゼ結合ジヒドロキシボリル化合物を用いるヒト血清中の糖化アルブミン値の測定

実験例2により得られた抗ヒトアルブミン抗体結合マイクロプレートの各ウェルに標準試料及び測定試料各々50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応液を各ウェルから除去した後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、試料中の未反応のアルブミンおよび糖化アルブミンを除去した。その後、アルカリホスファターゼ結合ジヒドロキシボリル化合物溶液200 μ lを計り入れ、更に室温で120分インキュベートした。反応液を各ウェルから除去した

後、100mM塩化ナトリウムを含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）300 μ lで各ウェルを3回洗浄し、洗浄液を各ウェルから除去した後、アルカリホスファターゼ活性測定のため100mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、2mM p-ニトロフェニルリン酸を含有する100mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）50 μ lを計り入れ、室温で60分インキュベートした。反応を停止するために1N水酸化ナトリウム溶液200 μ lを混合し、波長410nmで吸光度を測定した。標準試料と測定試料の吸光度から試料中の糖化アルブミン値を求めた。その結果を表4に示す。

【0040】

【表4】

		糖化アルブミン値 (%)	吸光度
標準試料		0. 0	0. 062
		10. 0	0. 145
		20. 0	0. 234
		40. 0	0. 398
測定試料	1	10. 6	0. 150
	2	14. 7	0. 187
	3	15. 3	0. 192
	4	17. 9	0. 215
	5	18. 7	0. 222
	6	30. 6	0. 321
	7	32. 4	0. 336
	8	36. 6	0. 370
	9	38. 5	0. 386
	10	41. 7	0. 412

【0041】

【発明の効果】本発明の測定方法により、糖化蛋白の測定において、例えば、糖化アルブミン量と総アルブミン

量を別々に測定することなく、簡便に総アルブミン量に対する糖化アルブミン量の相対比を求めることができるので、糖化蛋白を容易に測定することが可能となった。